

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08380

研究課題名(和文)尿細胞診でのゲノム不安定性を指標とした低異型度尿路上皮癌新規診断マーカーの開発

研究課題名(英文)Development of novel diagnostic markers for low grade urothelial cancer in urine cytology

研究代表者

松田 勝也(MATSUDA, Katsuya)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：20380967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、尿路上皮腫瘍40例を用いて、尿路上皮腫瘍での53BP1発現の意義と、診断学的有用性について病理組織学的に解析した。その結果、尿路上皮腫瘍における53BP1発現とFISH法による染色体異数性には有意な関連性があることが判明した。53BP1発現解析では、感度90%、特異度95.0%の精度で乳頭腫と低異型度尿路上皮癌を鑑別でき、感度80%、特異度100%の精度で低異型度尿路上皮癌と高異型度尿路上皮癌を鑑別できることが明らかとなった。免疫組織細胞化学を基本原理とする本診断法は、広く病理検査室で実施できるため、UroVysionと比較してコスト・簡便性という面でも有用である。

研究成果の概要(英文)：In this study, ten cases of normal urotheliums, urothelial papillomas, low-grade urothelial carcinoma (LGUC), and high-grade urothelial carcinoma (HGUC), respectively, subjected to double-labelled fluorescence immunohistochemistry of 53BP1 and Ki67. Genome instability (GIN) in urothelial carcinoma was also analysed by FISH. GIN by FISH was absent in normal urotheliums and papillomas, but was 40% and 100% in LGUC and HGUC, respectively. Presence of abnormal 53BP1 was 1.5% and 26.1% in papillomas and LGUC, respectively, and distinguished LGUC from papilloma with 90% sensitivity and 95% specificity. Furthermore, co-localization of abnormal 53BP1 and Ki67 was significantly increased in HGUC than in LGUC, distinguishing HGUC from LGUC with 80% sensitivity and 100% specificity. 53BP1 expression analysis in UCs may represent GIN. Immunofluorescence study of 53BP1 in combination with Ki67 may be useful in diagnosing urothelial neoplasms.

研究分野：人体病理学

キーワード：尿路上皮癌 ゲノム不安定性 DNA損傷応答 53BP1

1. 研究開始当初の背景

尿路上皮癌 (Urothelial carcinoma : UC) は腎盂、尿管、膀胱、尿道に発生する悪性腫瘍で、膀胱癌が最も頻度が高い。尿細胞診は、主に尿路上皮腫瘍細胞の有無を検索する非侵襲的かつ簡便な検出方法であるが、その陽性率は高異型度 (High-grade:HG) UC が約40~80%、低異型度 (Low-grade: LG) UC が約20~60%と特にLGUCの検出において十分な成績は得られていない。

UCの発生と進展には染色体のコピー数異常が関与している¹⁾。この染色体コピー数異常を検出し膀胱癌を診断するための

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) プロンプが米国FDAに認可されキット化されているが、LGUCの中には染色体異常を示さない例もあり、検出は困難であるという報告もなされている²⁾。

腫瘍抑制遺伝子p53結合タンパク質として同定されたp53 binding protein 1(53BP1) は全身の細胞に存在する核内タンパクで、DNA損傷応答 (DDR) が活性化した状態では、DNA二重鎖切断部位に速やかに集積し核内フォーカス (nuclear foci: NF) を形成する。

我々は、腫瘍進展過程におけるゲノム不安定性亢進の重要性に着目し、腫瘍組織での53BP1-NF形成とゲノム不安定性との関連および悪性化の指標としての意義を見出し、甲状腺癌、皮膚癌での53BP1-NF数の増加と異常発現を報告した^{3,4)}。さらに子宮頸部腫瘍では初期病変である異形成から53BP1-NFが観察され、核異型度に伴って53BP1発現が亢進することを報告した⁵⁾。

2. 研究の目的

53BP1 発現解析を尿細胞診に応用し、UCの細胞診断精度向上に寄与する、安価で簡便な診断法の開発を目的とするため、本研究期間では尿路上皮腫瘍組織による解析を行った。

3. 研究の方法

正常尿路上皮、乳頭腫 (UP)、低異型度尿路上皮癌 (LGUC) および高異型度尿路上皮癌 (HGUC) 各 10 例を用い、53BP1 と Ki-67 の二重標識蛍光免疫組織化学で発現パターンを解析した。53BP1 発現パターンは図 1 のように分類し、核内にびまん性に発現するびまん型と核内フォーカスが 1 μ m 以上の大型フォーカスを過剰発現型とした。さらに過剰発現型が Ki-67 と共発現する細胞を DDR 異常型として集計した (図 1)。

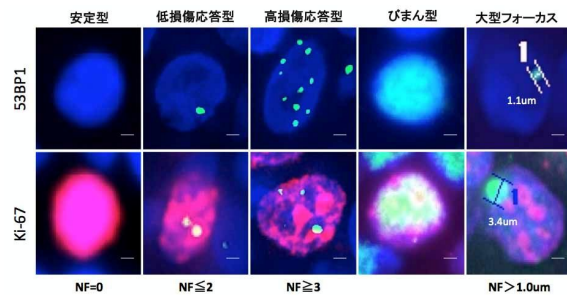


図1)53BP1発現型分類

染色体コピー数異常はマルチカラーFISH法で評価した (図 2)。染色体コピー数異常を伴う細胞が 10%を超える例を染色体異常症例として、53BP1 発現および尿路上皮腫瘍の核異型度との関連性について解析した。

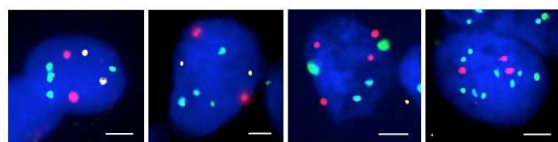


図2)尿路上皮腫瘍での染色体コピー数異常解析

4. 研究成果

LGUC では 53BP1 過剰発現型が 26.1% を占め UP (1.5%) に比し有意に高率だった。HGUC では 53BP1-DDR 異常型が 7.6% を占め LGUC (1.0%) に比し有意に高率だった (図 3)。HGUC では染色体コピー数異常を全例に認め LGUC (40%) に比し有意に高率であり、53BP1 発現との有意な関連性が認められた (図 4)。53BP1 発現は UP と LGUC、LGUC と HGUC の間で有意な相違があり、尿路上皮腫瘍のゲノム不安定性や DNA 損傷応答異常

と関連する。

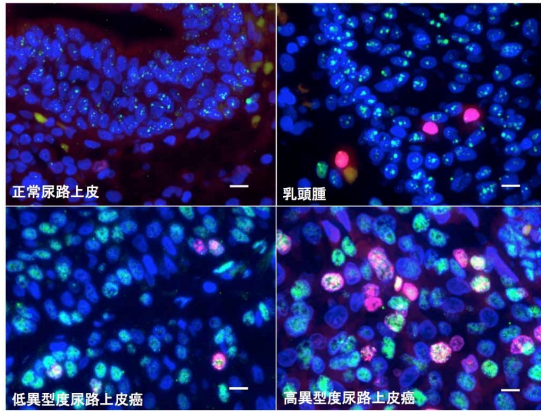


図3) 尿路上皮腫瘍での53BP1発現

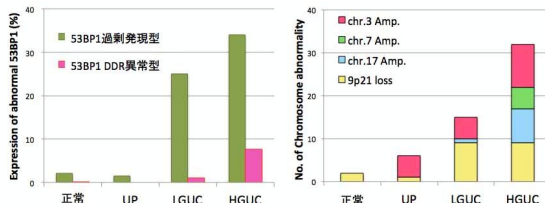


図4) 尿路上皮での53BP1発現と染色体コピー数異常との関連性

正常の尿路上皮では他臓器と比較してDNA 損傷応答が亢進している。この現象は常に尿という老廃物に曝露されている尿路上皮に特徴的な現象で、膀胱ではDNA 損傷が持続することによって染色体コピー数異常を誘導すると考えられた。そこで、尿路上皮でのDNA 損傷応答とそれに続くDNA 修復の反応性について p16^{INK4a}、p53、RAD51、XRCC4 発現と 53BP1 発現の関連性を解析した。その結果、正常組織では p16^{INK4a} と p53 の発現によって細胞増殖抑制と修復系（相同組換えと非相同末端結合）の活性化が生じていると考えられた。乳頭腫では、DNA 損傷応答はさらに亢進し p16^{INK4a} が過剰発現していた。乳頭腫は腫瘍性病変であるため細胞増殖ストレス亢進によって p16^{INK4a} 発現が亢進するが、正常組織と同様に、正常の p53 機能と修復系の活性化によって増殖活性が制御されていると考えられた。一方、癌組織では 9p21 の欠失によって p16 発現低下が生じ、p53 異常によって細胞増殖制御機構に異常が生じる。さらに Error Free な相同組換えの機能低下と Error Prone な非相同末端結合の活性化によ

て、さらなるゲノム不安定性が誘導されると考えられた（図5）。

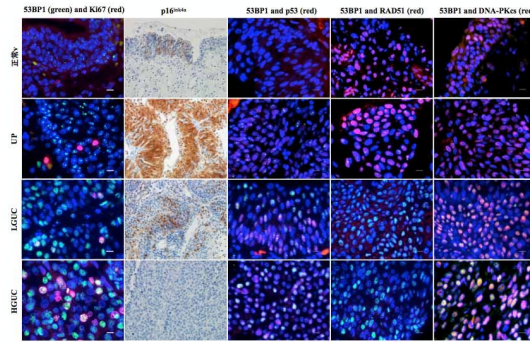


図5) 尿路上皮でのDNA損傷応答修復機能の解析

尿路上皮腫瘍での 53BP1 発現解析は、尿路上皮腫瘍のゲノム不安定性と核異型度を示す分子生物学的指標となる。安価で簡便な本手法は様々な施設で広く応用可能であり、診断困難な尿路上皮腫瘍の診断に有用である。現在、尿細胞診標本での発現解析を実施しており、尿細胞診での応用を検討している。

引用文献

- Orlow I et al. Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1995, 87(20), 1524-9.
- Fritsche HM et al. Multicolor FISH (UroVysion) facilitates follow-up of patients with high-grade urothelial carcinoma of the bladder. *Am J Clin Pathol.* 2010, 134, 597-603.
- Nakashima M et al. Foci formation of p53-binding protein 1 in thyroid tumors: activation of genomic instability during thyroid carcinogenesis. *Int J cancer,* 2008, 122(5), 1082-8.
- Naruke Y et al. Alteration of p53-binding protein 1 expression during skin carcinogenesis: association with genomic instability. *Cancer Sci.* 2008, 99(5), 946-51.
- Matsuda K et al. *Histopathology.* 2011, 59(3), 441-51.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 5 件)

松田勝也，川崎辰彦，赤澤祐子，近藤久義，井関充及，中島正洋：尿路上皮腫瘍での DNA 損傷応答分子 53BP1 発現プロファイリング：異型度に関連したゲノム不安定性と DNA 損傷応答．第 107 回日本病理学会総会，2018

Katsuya Matsuda, Tatsuhiko Kawasaki, Yuko Akazawa, Yuhmi Hasegawa, Masachiko Iseki, Masahiro Nakashima. Significance of p53-binding protein 1-Nuclear Expression in urothelial tumours: Implication of DNA damage response in association with tumour grades. 29th European Congress of Pathology, 2017

松田勝也，川崎辰彦，井関充及，中島正洋．膀胱尿路上皮腫瘍での DNA 損傷応答分子 53BP1 発現解析の意義．第 106 回日本病理学会総会, 2017

松田勝也．特別講演：尿路上皮腫瘍における DNA 損傷応答分子 53BP1 解析の意義．第 16 回泌尿器細胞診カンファレンス, 2017

松田勝也，川崎辰彦，大坪竜太，伊東正博，井関充及，中島正洋．DNA 損傷応答分子 53BP1 の腫瘍組織での発現の意義と細胞診への応用にむけて．第 54 回日本臨床細胞学会秋期大会, 2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 勝也 (MATSUDA, Katsuya)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号：20380967

(2)研究分担者

中島 正洋 (NAKASHIMA, Masahiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授

(3)研究協力者

川崎 辰彦 (KAWASAKI, Tatsuhiko)

井関 充及 (ISEKI, Masachika)